

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-306021

(43)Date of publication of application : 22.10.2002

(51)Int.Cl.

A01K 67/027  
A01K 67/00  
C12N 15/09  
C12Q 1/02  
G01N 33/15  
G01N 33/50  
// C12Q 1/66  
(C12Q 1/02  
C12R 1:91 )

(21)Application number : 2001-108629

(71)Applicant : OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE

(22)Date of filing : 06.04.2001

(72)Inventor : KAMEI YASUTOMI  
KAKITSUKA AKIRA

(54) TRANSGENIC MOUSE AND METHOD FOR SCREENING ANTI-OBESTIC MEDICINE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for screening an anti-obestic medicine or a medicine for treating a disease related to obesity.

SOLUTION: The transgenic mouse contains a PGC-1 gene transduced therein. The method for screening a substance for changing the interaction of PGC-1-PPAR $\gamma$  complex comprises adding a test substance to a system containing a vector which contains (1) PGC-1, (2) PPAR $\gamma$  and (3) a response sequence, a promoter, and a reporter gene connected so as to be expressed with the promoter, and then detecting the transcription activity adjustment of the PGC-1-PPAR $\gamma$  complex, while using the expression of the reporter gene as an index.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK** (USPTO,

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2002-306021

(P 2 0 0 2 - 3 0 6 0 2 1 A)

(43) 公開日 平成14年10月22日 (2002. 10. 22)

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テマコード (参考)
A01K 67/027		A01K 67/027	2G045
67/00		67/00	D 4B024
C12N 15/09	ZNA	C12Q 1/02	4B063
C12Q 1/02		G01N 33/15	Z
G01N 33/15		33/50	Z
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全16頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-108629 (P 2001-108629)

(22) 出願日 平成13年4月6日 (2001. 4. 6)

(71) 出願人 390000745

財団法人大阪バイオサイエンス研究所

大阪府吹田市古江台6丁目2番4号

(72) 発明者 亀井 康富

大阪府茨木市天王2-8-23 パセオ南茨木204号

(72) 発明者 垣塚 彰

大阪府高槻市芝谷町9-2

(74) 代理人 100062144

弁理士 青山 稔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスジェニックマウス及び抗肥満薬スクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 抗肥満薬又は肥満に関連する疾患を処置する薬剤のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 本発明の課題は、PGC-1遺伝子を導入したトランスジェニックマウス、及びPGC-1-P PAR $\gamma$ 複合体の相互作用を変化させる物質のスクリーニング方法であって、1) PGC-1、2) PPAR $\gamma$ 、及び3) 応答配列、プロモーター、及び、該プロモーターにより発現され得るよう連結されたレポーター遺伝子を含むベクターを含む系に、被検物質を添加し、レポーター遺伝子の発現を指標としてPGC-1-P PAR $\gamma$ 複合体の転写活性調節を検出することを含む方法により解決される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1のPPAR $\gamma$ コファクター1 (PGC-1) 遺伝子を導入し、PGC-1を過発現するトランスジェニックマウスであって、野生型マウスに比べ体重が減少し、褐色脂肪組織の質量が増加し、エネルギー消費量が増大し、非共役タンパク質-1 (UCP-1) 及び非共役タンパク質-3 (UCP-3) の発現量が増大したマウス。

【請求項2】 PGC-1-PPAR $\gamma$ 複合体の相互作用を変化させる物質のスクリーニング方法であって、

1) PGC-1、

2) PPAR $\gamma$ 、及び

3) 応答配列、プロモーター、及び、該プロモーターにより発現され得るよう連結されたレポーター遺伝子を含むベクター、を含む系に、被検物質を添加し、レポーター遺伝子の発現を指標としてPGC-1-PPAR $\gamma$ 複合体の転写活性調節を検出することを含む方法。

【請求項3】 スクリーニングする物質が、PGC-1-PPAR $\gamma$ 複合体の相互作用を増大させるものである、請求項2に記載のスクリーニング方法

【請求項4】 抗肥満薬又は肥満に関連する疾患を処置する薬剤のスクリーニングに用いる請求項2に記載の方法。

【請求項5】 請求項1に記載のトランスジェニックマウスを用いることを特徴とする抗肥満薬又は肥満に関連する疾患を処置する薬剤のスクリーニング方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はPPAR $\gamma$ コファクター1 (PGC-1) 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス、及びPGC-1-PPAR $\gamma$ 複合体の相互作用を変化させる物質のスクリーニング方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 先進国では飽食により肥満が増加している。肥満は糖尿病、高血圧、高脂血症などの様々な合併症をとまう。これらはいずれも慢性疾患であるために長期間にわたり個人の生活に影響する。またこのような慢性疾患の増加は、日本で問題となっている医療費の高騰の原因のひとつとなっている。このため、肥満に関連する疾患を処置する薬剤の開発は重要である。

【0003】 PPAR $\gamma$ は核内レセプターファミリーのメンバーである。PPAR $\gamma$ は脂肪組織に多く発現し、脂肪組織の形成に重要な役割をになう。加えて、PPAR $\gamma$ は褐色脂肪組織における熱産生にも役割を持つことが報告されている。PPAR $\gamma$ を介したシグナル伝達機構を解明することは脂肪組織の形成及び体熱産生（エネルギー消費）の分子的機構の理解につながるであろう。PPAR $\gamma$ の属する核内レセプターファミリーには、ステロイドや、甲状腺ホルモン、レチノイン酸（ビタミンA）といった脂溶性の低分子生理活性のレセプターが挙

げられる。活発な研究により、1) ステロイドホルモンや甲状腺ホルモン、レチノイン酸又はチアゾリンなどは、脂溶性のリガンドとしてそれぞれの特異的な核内レセプターに結合し、2) 脂溶性のリガンドと結合した核内レセプターは、標的遺伝子のプロモーター上の特定の塩基配列に2量体として直接結合し転写活性化を起す、という分子メカニズムが明かにされてきた。

【0004】 さらに、近年、3) リガンド依存的に核内レセプターとタンパク質-タンパク質相互作用し、遺伝子発現を制御する分子、コファクター（共役転写制御因子）の発見がなされた (Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., The coregulator exchange in transcription functions of Nuclear receptors, Genes Dev 14:121-141 (2000))。核内レセプターのコファクターは様々な組織、細胞にユビキタスに発現するが、PGC1 (PPAR  $\gamma$  coactivator 1) は、寒冷ストレスを受けたマウスの褐色脂肪細胞 (BAT) 及び骨格筋細胞での発現量の顕著な誘導が認められ、熱産生に役割を持つことが示唆されている (Puigserver, P. A., Cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis, Cell 92:829-939 (1998))。

【0005】 脱共役タンパク質 (uncoupling protein) -1 (UCP-1) はミトコンドリアのタンパク質であって、プロトンの電気化学的ポテンシャルの勾配を消散させ、酸化的リン酸化反応における電子伝達とATP合成反応を分断する機能を有する。UCP-1の発現は寒冷ストレスを受けるとBATで顕著に増加することが知られている。しかしながら、インビボにおけるPGC1の発現とUCP-1の発現との関係については未だ明らかでない。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、PGC-1を過発現するトランスジェニックマウスを作成した。該トランスジェニックマウスはコントロールマウスと比較すると褐色脂肪組織 (BAT) の量が増加し、特定の組織において、特にBATにおいてUCP-1及びUCP-3タンパク質の発現量が顕著に増加していることを見出した。また該トランスジェニックマウスはエネルギー消費量が増大し、体重が減少していた。これらの結果は、PGC-1を活性化すると体内のエネルギー消費量が増加し、運動などしなくても体重の減少、すなわち肥満の解消が起こることを示すものである。PPAR $\gamma$ とPGC-1との相互作用を増強あるいは、減弱させるような化合物を検索することにより、肥満を解消する薬剤や肥満に関連する疾患の治療薬をスクリーニングが可能となる。また本発明のトランスジェニックマウスを直接用いて上記薬剤の効果を確認することができる。

【0007】 即ち、本発明は、PGC-1遺伝子を導入しPGC-1を過発現するトランスジェニックマウスであって、野生型マウスに比べ体重が減少し、褐色脂肪組

織量が増加し、エネルギー消費量が増大し、UCP-1及びUCP-3タンパク質の発現量が増大したマウスに関する。

【0008】さらに本発明は、PGC1-PPAR $\gamma$ 複合体の相互作用を変化させる物質のスクリーニング方法であって、

1) PGC1、

2) PPAR $\gamma$ 、及び

3) 応答配列、プロモーター、及び、該プロモーターにより発現され得よう連結されたレポーター遺伝子を含むベクター、を含む系に、被検物質を添加し、レポーター遺伝子の発現を指標としてPGC1-PPAR $\gamma$ 複合体の転写活性調節を検出することを含む方法にも関する。

【0009】更に本発明は、トランスジェニックマウスを用いることを特徴とする抗肥満薬のスクリーニング方法にも関する。

【0010】

【発明の実施の形態】 (1) PGC1遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作成

まずマウスに導入すべきPGC1遺伝子を含むDNA構築物を調製する。そのようなDNA構築物は、例えば、PGC1を発現させるための適当なプロモーター、例えばCAGプロモーター、プロモーターの下流に配置されたラビット $\beta$ グロビンイントロン (Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991) Gene 108, 193-199)、イントロンの下流に配置されたPGC1遺伝子 (配列番号1)、PGC1遺伝子の下流に配置されたウサギ $\beta$ グロビンポリA付加部位 (Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991) Gene 108, 193-199) を含む (図1A)。CAGプロモーターはチキンアクチンプロモーターおよびサイトメガロウイルスエンハンサーからなる (Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991) Gene 108, 193-199)。CAGプロモーターおよび、ウサギ $\beta$ グロビンポリA付加部位はpCAGGSプラスミドに含まれている。pCAGGSは理化学研究所ライフサイエンスセンター筑波研究センター理研ジーンバンクより、誰でも入手可能である。次に、このDNA構築物をマウスに導入してトランスジェニックマウスを作成する。トランスジェニックマウスを作成する方法はよく知られており、羊土社「ジーンターゲッティングの最新技術」やGordon, J. W. (1993) Guide to Techniques in Mouse Development (Wassarman, P. M., and DePamphilis, M. L., Eds.), Academic Press, San Diegoなどに詳細に記載されている。簡単にその方法を説明すると以下のようである。

1) 雌マウスにホルモンを注射して強制的に過剰排卵させ、受精を行い、交尾後1日目の卵管から受精卵を摘出する。

2) 核が融合する前の時期の受精卵に顕微鏡下にPGC1遺伝子を含むDNA構築物を雄性全核中にマイクロインジ

エクシオンにより注入する。

3) こうした操作を施した受精卵を約20個ぐらい、偽妊娠雌マウス (仮親) の子宮又は卵管内に移植する。

4) この雌マウスを通常通り飼育し、仔マウスを出産させる。PGC1遺伝子導入の成否を仔マウスの尾の先端を切り取って抽出したDNAのサザンブロットにより確認する。

【0011】 (2) PGC1遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの性質

10 本発明のPGC1遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは、非トランスジェニックマウス (対照マウス) に比べて以下のような特徴を有する。

(i) 対照マウスより大きいBAT質量を有する。

(ii) BATの脂肪滴は対照マウスのそれより小さく、数が多い。

(iii) 体重が小さい。

(iv) エネルギー消費量が大きい。

(v) UCP-1及びUCP-3の発現量が増加する。

20 UCP-1の発現量はBAT、腎臓細胞、骨格筋細胞で増加し、UCP-3の発現量はBAT、腎臓細胞、骨格筋細胞で増加する。

これらの結果は、PGC-1の発現量が増加すると、BAT細胞などにおいてUCP-1の発現が増加して、電子伝達とATP合成反応が分断され、その結果、脂肪が消費されて、熱が発生しエネルギー消費量が増加することを示すものである。ここにPGC1の発現とUCP-1の発現のインビボにおける関係がはじめて明らかになった。UCP-1遺伝子のプロモーターはPPAR $\gamma$ の結合部位を有する (Sears, I. B. 等, Mol. Cell Bio 1, 16; 3410-3419 (1996)) ことを考慮すると、PGC-1の発現の増加によりPPAR $\gamma$ -PGC-1複合体の転写活性が上昇しUCP-1の発現量が増加するものと考えられる。

【0012】 (3) PGC-1-PPAR $\gamma$ 複合体の相互作用を変化させる物質のスクリーニング方法

本発明は、PGC-1-PPAR $\gamma$ 複合体の相互作用を変化させる物質のスクリーニング方法であって、

1) PGC-1、

2) PPAR $\gamma$ 、及び

40 3) 応答配列、プロモーター、及び、該プロモーターにより発現され得よう連結されたレポーター遺伝子を含むベクター、を含む系に、被検物質を添加し、レポーター遺伝子の発現を指標としてPGC-1-PPAR $\gamma$ 複合体の転写活性調節を検出することを含む方法にも関する

【0013】 PPAR $\gamma$ の遺伝子配列及びアミノ酸配列は公知である (Dreyerら, Cell, 第68巻, 第879~887頁 (1992年); Zhuら, J. Biol. Chem., 第268巻, 第26817~26820頁 (1993年); Kliererら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 第91巻, 第7355~7359頁 (1994年); Mukherjeeら,

J. Biol. Chem., 第272巻、第8071~8076頁(1997年); Elbrechtら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 第224巻、第431~437頁(1996年); Chemら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 第196巻、第671~677頁(1993年); Tontozら、Genes&Development, 第8巻、第1224~1234頁(1994年); Aperlら、Gene, 第162巻、第297~302頁(1995年)). PPAR $\gamma$ には、PPAR $\gamma$ 1及びPPAR $\gamma$ 2の2種のアイソフォームが存在し、PPAR $\gamma$ 1はPPAR $\gamma$ 2と比較するとN末端側の30アミノ酸が欠失しているが、その他のアミノ酸配列は同じであり、いずれも脂肪組織に発現していることが知られている。そのリガンド結合領域は、他の核内受容体とのホモロジー等から、PPAR $\gamma$ 2では、N末端から約174番目から475番目までのアミノ酸を含む領域に相当すると推定される。

【0014】本発明のPGC1-PPAR $\gamma$ 複合体の相互作用を変化させる物質のスクリーニング方法において、用いるPPAR $\gamma$ は全長アミノ酸配列を有する必要はなく、場合によっては全長より短いか、あるいは、長いものを用いることができる。また場合により、その機能を損なわない範囲で付加的な構成、或いは、その天然の配列とは異なる配列、即ち、欠失、置換または付加等を有していてもよい。

【0015】PPAR $\gamma$ を蛋白質として直接スクリーニング系に添加することもできるし、また、PPAR $\gamma$ をコードする遺伝子を含むベクターを用いて、スクリーニング系中で該蛋白質が発現されるように系を構築することも可能である。

【0016】マウスのPGC-1のアミノ酸配列を、配列表の配列番号2に示す。遺伝子暗号の縮重の性質から、配列番号2のアミノ酸配列をコードする多数の異なる核酸配列を構築することが可能であることが理解される。配列番号1に記載のヌクレオチド配列は、可能な多数のPGC-1をコードする配列のうちの1つに過ぎない。従って、以下に記載の、並びに、付随する実施例中の本発明の好ましい核酸分子、ベクター等は例示的なものであり、本発明の範囲を減縮することを目的としたものではない。PGC-1を蛋白質として直接スクリーニング系に添加することもできるし、また、PGC-1をコードする遺伝子を含むベクターを用いて、スクリーニング系中で該蛋白質が発現されるように系を構築することも可能である。

【0017】これらの配列は、種々の方法により製造され得、そのため本発明はいかなる特定の製造手法にも限定されない。本発明の核酸配列は、DNA合成、cDNAクローニング、ゲノムクローニング、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術、及び、これらの手段の組合せを含む多数の製法により製造され得る。これら、及び、その他の技術がManiatisらの『Molecular Cloning: A Laboratory Manual』(ColdSpring Harbor Press, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (19

89年))、または、『Current protocols in Molecular Biology』(F.M. Ausubelら、1989年及び増刊)に記載されている。

【0018】PPAR $\gamma$ をコードする遺伝子、並びに、PGC-1をコードする遺伝子は、通常の遺伝子組換え技術により構築することができる。例えば、既知のアミノ酸配列及び塩基配列情報等をもとに設計し、合成したプライマーやプローブを用い、PCR法やハイブリダイズ法によりcDNAライブラリーをスクリーニングして得ることができる。これらを適当なプロモーターの下流に連結したベクターを作成することにより、適当な宿主中でPPAR $\gamma$ 、並びに、PGC-1を各々発現させることができる。ベクターとしては、それらに限定されるわけではないが、プラスミド、コスミド、及び、ウイルス(ファージを含む)が含まれる。また、これらをコードするDNAは、必要な機能を損なわない範囲で、1または数個の塩基の付加・欠失・置換等されていてもよい。PPAR $\gamma$ をコードする遺伝子、及び、PGC-1をコードする遺伝子を、それぞれ別に発現されるよう1つのベクターとして構築することも可能である。

【0019】応答配列、プロモーター、及び、該プロモーターに発現可能に連結されたレポーター遺伝子を含むベクターとしては、それらに限定されるわけではないが、プラスミド、コスミド、及び、ウイルス(ファージを含む)が含まれる。該ベクターにおいて応答配列、プロモーター、及びレポーター遺伝子は5'から3'方向に順次連結される。

【0020】PPAR $\gamma$ のような核内受容体は標的遺伝子のプロモーター上の応答配列とよばれる特異的な配列に結合し、リガンド依存的に転写を活性化すると考えられている。PPAR $\gamma$ が結合する配列はPPRE(PPAR $\gamma$  Responsive Element, PPAR $\gamma$ 応答配列)と呼ばれる。PPREの配列は公知である(配列番号13)(Kliever SAら、Nature, 358: 771-754)。

【0021】レポータープラスミドのプロモーターは用いる細胞で認識される種類のプロモーターであればいずれのプロモーターでも使用できる。好ましいプロモーターの例は、チミジンキナーゼプロモーター、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーターがある。

【0022】本発明のベクター中のレポーター遺伝子は、特に限定されないが安定でかつ活性の定量が容易なものが好ましい。場合によっては、転写されたmRNAを、ハイブリダイゼーション法、PCR法等の手段により側定することも可能である。レポーター遺伝子として酵素の遺伝子等を用いた場合には、その酵素活性により容易に測定することができ好ましい。例えば、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等が挙げられる。

【0023】該ベクターもまた、通常の遺伝子組換え技術を用いて、設計、構築することができる。スクリーニングが細胞内で行われる場合、ベクターは細胞内にプラスミドとして染色体とは別個に存在させることもできるし、宿主の染色体内に相同組換え等の周知の技術を用い導入して用いることもできる。

【0024】スクリーニング系で用いる細胞は、トランスフェクションが可能な細胞であればくに種類は問わない。そのような細胞にはCV-1細胞株(大日本製薬)を含む。

【0025】上述のようにして得られた要素を含むスクリーニング系に被検物質を添加し、スクリーニング系がイン・ヴィトロの場合には直接レポーター遺伝子の発現を、イン・ビボの場合には必要であれば、細胞の培養を行ってからレポーター遺伝子の発現を測定することにより、PGC1-PPAR $\gamma$ 複合体の転写活性に影響を与える物質のスクリーニングを行うことができる。即ち、ある化合物を本発明のスクリーニング系に加えた場合、ルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子の発現量が増加(減少)したならば、その化合物はPGC-1とPPAR $\gamma$ との相互作用を増大(減少)させた結果であると考えることができる。前述のようにイン・ビボにおいてPGC-1の発現量が増加すると、BAT細胞などにおいてUCP1の発現量が増加して、電子伝達とATP合成反応が分断され、その結果、脂肪が消費されて、熱が発生しエネルギー消費量が増加することが本発明により明らかになった。従って本発明のスクリーニング系によりスクリーニングされたPGC-1-PPAR $\gamma$ 複合体の転写活性を増大させる物質はUCP1の発現量を増加させ抗肥満薬又は肥満に関連する疾患を処置する薬剤に用い得る。また本発明のトランスジェニックマウスに抗肥満薬又は肥満に関連する疾患を処置する薬剤のための候補物質を直接投与してその効果を確認することもできる。

【0026】

#### 【実施例】実施例1

##### プラスミドpCAGGS-PGC1の作成

pCAGGSプラスミドはCAGプロモーター(チキンアクチンプロモーターおよびサイトメガロウイルスエンハンサーからなる)および、ウサギ $\beta$ グロビンポリA付加部位を含むDNAである。pCAGGSに組み込んだ遺伝子断片は、さまざまな細胞、組織で蛋白質を高発現することが可能である。(Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991) Gene 108, 193-199) pCAGGSは理化学研究所ライフサイエンスセンター筑波研究センター理研ジーンバンクより、誰でも入手可能である。マウスのPGC-1のcDNAはマウス胚cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより得、配列決定により確認した。PGC-1のcDNAの完全長のコード領域(配列番号1)をpCAGGSのEcoRI部位に挿入することにより、pCAGGS-PGC-1を構築した。

#### 【0027】実施例2

##### トランスジェニックマウスの作成

導入遺伝子断片をpCAGGSを制限消化(SalI/BamHI)することによりpCAGGS-PGC-1から切りだし、電気泳動により精製した(2 ng/ $\mu$ l)。この断片は5 kbを有する。PGC1遺伝子はCAGプロモーター(チキンの $\beta$ -アクチンプロモーター及びサイトメガロウイルスの前初期エンハンサーを有する)の支配下にあり、ラビット $\beta$ -グロビンイントロン及びそのポリアデニル化部位を含む(図1A)。ドナーマウスを標準的な方法(23)を用いて準備した。雄のBDF1と交配させた雌のBDF1(C57BL/6 $\times$ DBA/2)から受精卵を回収し、標準的な方法により、マイクロインジェクションを行なった。即ち、凍結した受精卵(日本SLC、日本クレアなどから購入可能)を解凍し、顕微鏡のガラスチャンパー上にのせ、顕微鏡で針先を受精卵に近付け、DNA溶液をインジェクションマイクロマニピュレーター(Leica社)を用いて受精卵に注入する。その後、DNA溶液を注入した受精卵を、受容雌マウスの卵管内に移植した。この操作は羊土社「ジーンターゲットの最新技術」やGordon, J. W. (1993) Guide to Techniques in Mouse Development (Wasserman, P. M., and DePamphilis, M. L., Eds.), Academic Press, San Diegoなどに記載されており、それに従って行なった。受容雌マウスより、マウスを発生させる。この操作によりトランスジェニックマウスを作成した。導入遺伝子のコピー数を仔のマウスの尾のDNAを用いるサザンブロッティングにより測定した。サザンブロッティングのために、pCAGGS-PGC-1の0.6 kbのEcoRI断片をプローブとして用いた。結果を図1Bに示す。各マウスの導入されたPGC-1遺伝子のコピー数を、サザンブロットからのオートラジオグラフィーのデンスitrometrixスキャンニングにより評価した。導入遺伝子の最高コピー数(100以上)を有するマウスは、呼吸増加(荒い息)を示し、非常に痩せた後に8週齢で死んだ。最低のコピー数、たった2コピーを有するマウス(図1、BのラインA3)は導入遺伝子の検出可能なシグナルを示さなかった。従って以下の実験のためにラインA1(コピー数64)及びA2(コピー数53)を用い、類似の結果を得た。ファウンダーマウスをC57BL/6マウスと共に飼育することによって子孫を生成させた。マウスを12時間 光/12時間 暗(午前6時点灯)に維持した。マウスのケアは規格化されたガイドラインに従って行なった。

#### 【0028】実施例3

##### PGC1遺伝子導入トランスジェニックマウスの性質

##### (3-1) トランスジェニックマウスの形態学的、組織学的性質

形態学的性質: PGC-1を発現する確立されたマウスラインは正常な妊娠、誕生及びリッターサイズを有し、

発育的に正常で、生育可能であり、外見上健康であるように見える。これらのトランスジェニックマウスの外観及び挙動も正常である。若いPGC-1トランスジェニックマウスは非トランスジェニックマウスのそれと似た体重を有していた。しかしながら、対照マウスにおいては体重の年齢依存的増加が観察されたのに対し、トランスジェニックマウス(24週齢)は野性型のリッターメイトより有意に小さい体重であった(対照マウス $28.7 \pm 2.7$  g及びトランスジェニックマウス $25.9 \pm 3.4$  g、 $p < 0.05$ ) (図4A)。この相違はエネルギー消費の制御におけるUCPの生理学的機能に基づいて、トランスジェニックマウスにおけるエネルギー消費の増加の結果かもしれない。なお統計的比較はStudent's t-testを用いて行なった。統計的有意性を $p < 0.05$ として定義した(以下同じ)。

#### 【0029】BATの組織学的分析

マウスを左心室を介してPBS、その後4%パラホルムアルデヒド(pH7.4)で灌流し、次にBATを除去し、パラフィンに埋め込んだ。脱パラフィンしたセクションをヘマトキシリン及びエオシンで染色するか、免疫組織化学的方法で染色した。免疫パーオキシダーゼ染色は以前に報告されたUCP-1に対するポリクローナル抗体を用いて行なった。簡単に言えば、内因性のパーオキシダーゼ活性を、メタノール中の0.3%  $H_2O_2$  中で20分間インキュベートすることによってブロックした。次に、一次抗体、即ち抗-UCP-1抗体と共に8時間、4℃でインキュベートした後、組織セクションを10分間2%の正常なヤギ血清にさらした。そのUCP-1抗体を使用のためPBSで1:500で希釈した。セクションを次にビオチニル化ヤギ抗ラビットIgG二次抗体と10分間インキュベートした。そのセクションをアビジン-ビオチン-パーオキシダーゼ複合体(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)と次に5分間インキュベートし、50mM Tris-HCl(pH7.5)中の0.5mg/mlの3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド(Sigma, St. Louis, MO, USA)及び3µl/ml  $H_2O_2$  での処理により視覚化した。各工程の間に、セクションをPBS中で3回洗浄した。免疫組織化学的特異性の対照として、抗-UCP-1抗血清の代わりに同じ希釈度で正常なラビット血中でインキュベートしたセクションは認識し得るシグナルを与えなかった。脂肪滴及び核の数、又はBATの脂肪滴の平均直径は組織学的セクションの6つの顕微鏡的視野の計数又は測定に基づく。

【0030】PGC-1トランスジェニックマウスは非トランスジェニックマウスリッターメイト対照より大きいBAT質量を有する(図3A、12週齢でPGC-1トランスジェニックマウスにおいては $0.73 \pm 0.14$  g及び対照マウスでは $0.49 \pm 0.12$  g、 $p < 0.05$ )。組織学的には対照マウスのBATは典型的

な褐色脂肪細胞を示したが、対照的にPGC-1トランスジェニックBAT細胞は多数の細胞質の脂肪滴を有していた(図3B及びC)。これらの脂肪滴は、対照マウスに存在するものより小さく、(図3D、脂肪滴の平均直径: PGC-1トランスジェニックマウスにおいては $4.2 \pm 1.8$  µm及び対照マウスでは $10 \pm 3.2$  µm、 $p < 0.05$ )、数が多い(図3E、PGC-1トランスジェニックマウスにおいては細胞あたり $14.7 \pm 3.9$  脂肪滴及び対照マウスでは細胞あたり $9.6 \pm 2.1$  脂肪滴、 $p < 0.05$ )。これらはPGC-1トランスジェニックマウスのBATは活動亢進性の呼吸を行なっていることを示唆する。事実、UCP-1タンパク質の発現は、UCP-1タンパク質の免疫組織化学的分析により判断して、対照マウスのそれに比べPGC-1トランスジェニックマウスのBATセクションで有意に上昇した(図3、C)。

#### 【0031】(3-2)トランスジェニックマウスにおけるPGC1発現量

PGC-1導入遺伝子の発現をノーザンブロット分析により最初に評価した。ノーザンブロッティングは以前に記載されたように行なった(24)グアニジンイソシアネートによる抽出、その後の5.7M CsClの層での遠心分離により細胞及びマウス組織から全RNAを単離した。20µgの全RNAを電気泳動により分離し、次にナイロン膜(アマーシャムファルマシアバイオテック、東京)に移した。その膜を、0.65M NaCl、0.1M PIPESナトリウム、pH7.4、5mM EDTA、SDS、ウシ血清アルブミン、ポリビニルピロリドン、及びFicoll 400各0.1%、並びにコウシの胸腺DNA 100µg/mlを含む50%ホルムアミド中で42℃で6時間予備ハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションはランダムプライマー標識cDNAプローブの存在下に同じ条件で一晩行なった。ハイブリダイゼーションの後、膜を2時間、65℃で洗浄用緩衝液(0.2% x SSC, 0.1% SDS)で一定速度で攪拌しながら洗浄し、次にオートラジオグラフィに付した。定量的な分析は、イメージアナライザー(FLA2000, 富士フィルム)を用いて行なった。

【0032】図2Aは、8週齢のPGC-1トランスジェニックマウス(ラインA1)及び対照のリッターメイトマウスの組織から単離された全RNAに対するPGC-1プローブとのハイブリダイゼーションの強度を示す。導入遺伝子特異的なプローブ(図1A、プローブ2)を用いた時、3kbのバンド(矢印で示す)のみが検出された。CAGプロモーターはユビキタスな組織で活性が強いことが報告されている。しかしながら、予期しないことに、このプロモーターはBAT、心臓、腎臓、骨格筋等のいくつかの限られた組織ではPGC-1導入遺伝子を高発現するが、例えば肝臓中では低発現である



(図2A)。これらの発現プロファイルは内因性のPGC-1発現パターンによく対応する(図2A)。この観察はPGC-1発現についての重要な組織特異的な調節シス因子が使用したPGC-1 cDNAにあるかもしれないことを示唆する。2つの独立なトランスジェニックライン(図1B, ラインA1及びA2)は類似の発現パターンを示し、導入遺伝子発現はマウスゲノムにおける挿入部位により大きく影響されないことを示唆する。

#### 【0033】(3-3)トランスジェニックマウスにおけるUCPの発現量

トランスジェニックマウス及び対照マウスの様々な組織におけるUCPの発現に及ぼすPGC-1遺伝子発現の影響を調べた。この目的に、PGC-1トランスジェニックマウス及びリッターメイト対照中のUCPの発現をノーザンブロット分析により比較した。同じブロットを放射標識したUCP-1、UCP-2、及びUCP-3 cDNAと一つづつハイブリダイズさせた(図2B-E)。

【0034】マウスUCP-1、UCP-2、UCP-3及びグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のcDNA断片はマウスのBAT全RNAを用いる第1鎖cDNAからポリメラーゼチェーン反応により得た。第1鎖cDNAはT-プライムドファーストストランドキット(アマーシャムファルマシアバイオテック、東京)を用いて調製した。使用したポリメラーゼチェーン反応のプライマーは以下のである。

【0035】UCP-1 (Genbank Accession, U63419)  
(フォワード) 5'-ACGCCTCTCTGCCCTCCAAGCCAG-3' (配列番号3)

(リバーズ) 5'-TCAGTATCTCTTCTCCAAGTTGC-3' (配列番号4)

UCP-2 (Genbank Accession, U82819)

(フォワード) 5'-GGGCTGGTGGTGGTCGGAGA-3' (配列番号5)

(リバーズ) 5'-TCAGCATGGAGAGGCTCAGA-3' (配列番号6)

UCP-3 (Genbank Accession, AF001787)

(フォワード) 5'-GAGGGACTATGGATGCCTAC-3' (配列番号7)

(リバーズ) 5'-TTGCCTTGTTCAAAACGGAG-3' (配列番号8)

GAPDH (Genbank Accession, M32599)

(フォワード) 5'-TCGTCCCGTAGACAAAATGG-3' (配列番号9)

(リバーズ) 5'-TCTTACTCCTTGGAG GCCAT-3' (配列番号10)

【0036】更に、ブロットの長い曝露によりUCP-1発現は、BAT中だけではなく、腎臓及び骨格筋を含む他の組織中でも誘導されることが示された(図2C)。UCP-3のmRNAレベルは、トランスジェニ

ックマウスのBAT、心臓、及び骨格筋中で増加した(図2D)。UCP-2のmRNAの発現は心臓において野生型のその56%まで減少し、骨格筋で僅かに増加した。(図2E)。PGC-1トランスジェニックマウスのBAT中でのUCP-1のmRNAの誘導は、寒冷条件に曝露された場合の非トランスジェニックマウスのBAT中でのUCP-1のmRNAの誘導に匹敵するか、又はそれより大きい。これらのデータは生理学的に有意な量の機能的なPGC-1タンパク質がトランスジェニックマウスのBATで導入遺伝子から製造されることを示唆する。

#### 【0037】(3-4)トランスジェニックマウスにおけるエネルギー消費量

酸素消費量及び二酸化炭素生成量を質量分析器及びコンピュータに結合した間接熱量計システムを用いて測定した。マウスをガス質量分析器(WSMR-1400, Westron, Chiba, Japan)に連結したオープンサーキットのプラスチックの呼吸チャンパー(24x46x18 cm)に個別に置いた。空気流を2L/分に調節した。ガス分析を10時から翌日の9時まで行なった。試料を対照としての部屋の空気中で2分ブロックで連続的にモニターした。運動活性を各呼吸チャンパーの下に置いたAnimex-III (Shimazu, Kyoto, Japan)により10分ごとに自動的に記録した。エネルギー消費を計算した(Komenami, N., J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo), 41:395-407)。生理学的測定についてのデータは雄のマウスから得た。雌のマウスからも同様の結果を得た。

【0038】PGC-1トランスジェニックマウスのエネルギー消費は12週齢で対照マウスより有意に大きかった。(静止エネルギー消費: 対照マウス75.8 ± 2.4 kcal/日/kg 0.75及びPGC-1トランスジェニックマウス94.9 ± 5.7 kcal/日/kg 0.75; 自由運動状態を含む全エネルギー消費: 対照マウス143 ± 2.0 kcal/日/kg 0.75及びPGC-1トランスジェニックマウス165 ± 6.6 kcal/日/kg 0.75, p < 0.05) (図4, B及びC)。これらの結果は対照及びトランスジェニックマウス間の体重差はそれらのエネルギー消費の差によることを示唆する。

#### 【0039】実施例4

##### PPAR $\gamma$ をコードするベクター(pCMX-PPAR $\gamma$ )の構築

##### (1) PPAR $\gamma$ 1の遺伝子の単離

PPAR $\gamma$ 1のcDNAを、マウス脂肪細胞から調製したRNAからの逆転写反応により得られたcDNAから、PCR法によって取得した。PCRにはプライマーとして以下の配列番号11及び12に示した配列を用いた。これらプライマーは、遺伝子データベースGenbankのアクセッション番号MMU09138に記載されたマウスPPAR $\gamma$ の遺伝子配列を元に設計し、プライマーの末端に

は、ベクターに挿入するための制限酵素認識部位を付加した。得られた1518塩基対断片は完全長のマウスPPAR $\gamma$ をコードしている。

配列番号11: ATGGGTGAAACTCTGGGA GA

配列番号12: CTAATACAAGTCCTTGTA GA

(2) PPAR $\gamma$ 蛋白質発現するためのプラスミドの構築  
このPPAR $\gamma$  cDNAは平滑末端処理し、pCMX (Formanら、Cell、第83巻、第803~812頁)をHindIII 10  
I認識部位によって切断し、平滑末端処理したベクターに挿入した。これによりPPAR $\gamma$ の蛋白質を発現する

PPRE配列:

TCGAGAGGGAGGAGGACAAAGGTCACGTTCCGGAG

(配列番号13)

PPRE配列(相補鎖):

TCGACTCCCGAACGTGACCTTTGTCTGGTCCCTGT

(配列番号14)

#### 【0041】実施例6 スクリーニング系の構築

細胞株CV-1(大日本製薬(株)製)を用い、これに、PGS-1を発現するプラスミドpCAGGS-PGC1 20  
(実施例1)、PPAR $\gamma$ を発現するpCMX-PPAR $\gamma$  (実施例4)、およびリポータープラスミドPPRE-TK-luc (実施例5)でトランスフェクトした。CV-1細胞を10%のウシ胎児血清を補ったDulbeccoの改変Eagle培地(DMEM)に維持した。細胞をリン酸塩で緩衝化した生理的食塩水で洗浄し、0.125%のトリプシンで処理し、24ウェルのディッシュにプレートした。トランスフェクションの2時間前に培地を5 $\mu$ g/mlのインスリン、5 $\mu$ g/mlのトランスフェリン及び0.01%の脂肪酸を含有しないウシ血清アルブ 30  
ミンを補った新鮮なDMEMで置換した。トランスフェクションはリン酸カルシウム沈殿法により行なった。細胞を、250ngのリポータープラスミドPPRE-TK-luc、250ngの対照プラスミド(pCMX- $\beta$ gal)、30ngのpCMX-PPAR $\gamma$ 、及び変化させた量(0ng~60ng)のpCAGGS-PG

ためのプラスミドpCMX-PPAR $\gamma$ を得た。

#### 【0040】実施例5

リポータープラスミド(PPRE-TK-luc)の構築  
PPAR $\gamma$ が結合する配列PPRE (配列番号13) (Kliver SAら、Nature、358: 771-754)および、相補鎖(配列番号14)のオリゴヌクレオチドを合成し、混ぜ合わせ、チミジンキナーゼプロモーター(-105/+51)とルシフェラーゼ遺伝子を有するTK-lucベクター (Formanら、Cell、第83巻、第803~812頁)をSalI認識部位によって切断したベクターに挿入した。これによりリポータープラスミドPPRE-TK-lucを得た。

C1、及びウエルあたり全体で600ngのDNAとなるような量の空のpCAGGSで、24ウェル中で6時間トランスフェクションした。DNA沈殿物を洗浄除去した後、細胞を血清を含まない培地(ウシ胎児血清を添加しないDMEM)で36時間インキュベートした。次に細胞抽出物を調製し、ルシフェラーゼ及び $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を分析した。ルシフェラーゼの活性を比光単位で測定し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性でノルマライズした。3回の実験結果を平均し、PGC-1の存在しない場合を基準として結果を図5に示す。PGC-1が増加するに従ってルシフェラーゼの発現量が増加する。PGC-1がPPAR $\gamma$ と相互作用し、複合体を形成することによって、転写活性が増大したものと考えられる。従って、ある化合物を本発明のスクリーニング系に加えた場合、ルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子の発現量が増加(減少)したならば、その化合物はPGC-1とPPAR $\gamma$ との相互作用を増大(減少)させた結果であると考えられることができる。

#### 【0042】

#### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

- (110) Osaka Bioscience Institute
- (120) Transgenic Mouse and Method for Screening Anti-obesity Drug
- (130) 176973
- (160)

#### 【0043】

- (210) 1
- (211) 3029
- (212) DNA
- (213) mouse

#### (400) 1

aattcggcac gaggllgccl gcaigagltgt gtgctgtgtg lcagagtgga ttggagltga 60  
aaaagcttga ctggcgatcat tccgggagctg gatggcttgg gacatgtgca gccaaagactc 120

15

16

igtatggagt gacatagagt gigtgtctt ggltggtag gaccagctt tllgcccaga 180  
 tcttcttgaa ctgacctt ctgaacttga tglgaatgac tlggatacag acagcttct 240  
 ggggtgattg aagltggtag gcgaccaatc ggaaatcata tccaaccagt acaacaatga 300  
 gccitgcgaac atatttgaga agatagaatga agagaatgag gcaaacitgc tagcggtctt 360  
 cacagagaca ctggacagtc tccccgttga tgaagacgga ttgcccctat ttgatgcact 420  
 gacagatgga gccgtgacca ctgacaacga ggccagctct tcttccatgc ctgacggcac 480  
 ccttccccct caggaggcag aagagccgtc tctacttaag aagctcttac tggcaccagc 540  
 caacactcag ctgagctaca atgaatgcag cggctttagc actcagaacc atgcagcaaa 600  
 ccacaccac aggtatcaga caaacctgc cattgttaag accgagaat caaggagcaa 660  
 taaagcgaag agcattgtc aacagcaaaa gccacaaaga cgtccctgtc cagagcttct 720  
 caagiatctg accacaacg atgaccttcc tcacacaaa cccacagaaa acaggaacag 780  
 cagcagagac aaatgtctt ccaaaaagaa gtcccatata caaccgagt cgcaacatgc 840  
 tcaagccaaa ccaacaactt tctcttcc tctgaccca ggtcaccaa atgacctcaa 900  
 gggltcccca ttigagaaca agactatga gcgaacctta agtltggaac tcttggaaac 960  
 tgcaggctta acttctcca caactctcc tcataaagcc aaccaagata acccttcaa 1020  
 ggcttgcga aagctgaagc cctcttgaa gaccgtgtg ccaccgcaa ccaagagggc 1080  
 ccggtacagt gagtgtctg gtacccaagg cagccactcc accaagaaag gggccagaca 1140  
 atctgattg tacgcacaac tcagcaatc ctgagggctc agccgaggac acgaggaag 1200  
 gaagactaaa cggcccagtc tccgctgtt tggtagcat gactactgtc agtactcaa 1260  
 ttccaaaacg gatatactca ttaacatac acaggagctc caagactta gacaactaga 1320  
 ctccaaagt gccctctgt actggcagg gcacatctt tcttccacag attcaggcca 1380  
 gtgtacctg agagagact tggaggccag caagcaggtc tctcttgca gcaccagaaa 1440  
 acagctccaa gaccaggaaa tccgagcggg gctgaacaag cacttccgtc atccctgtca 1500  
 agctgtgtt gacgacaaat cagacaagac cagtgaacta agggatggcg acttcagtaa 1560  
 tgaacaatc tccaaactac ctgtgttat aaattcagga ctgacctg atggcctatt 1620  
 tgaatcagt gaagatgaaa gtagataact gagctacct tgggatggca cgcagcccta 1680  
 ttcatgttc gatgtgtgc ctctgtctc ttctttaac tctccgtgc gagactcagt 1740  
 gtaccaccg aaatcttat ttctcaaaag accccaaagg atgcgtctc gtccaagatc 1800  
 ctcttctga cacaggctgt gttcccgat accatatcc aggtcaagt caaggtcccc 1860  
 aggcagtaga tctcttcaa gatctgtta ctactatga tcaagccact acagacaccg 1920  
 cacacaccgc aattctccct tgtatgtgag atcacgttca aggtcaccct acagccgtag 1980  
 gcccaggtac gacagctatg aagctatga gcacgaaagg ctcaagaggg atgaataccg 2040  
 caaagagcac gagaagcggg agtctgaaag ggccaaacag agagagaggc agaagcagaa 2100  
 agcaattgaa gagcgccgtg tgattacgt tggtaaaatc agacctgaca caacgcggac 2160  
 agaattgaga gaccgtttg aagttttgg tgaattgag gaatgcaccg taaatctgcg 2220  
 ggaatgagga gacagctatg gtttcatcac ctaccgttac accgtgtacg ctctgcgtgc 2280  
 tcttgagaat ggatatactt tacgcaggtc gaacgaaact gacttcgagc tgtactttg 2340  
 tggacggaag caattttca agtctaact tgcagaccta gataccaact cagacgattt 2400  
 tgacctgtc tccaccaaga gcaagtatga ctctctggat ttgatagtt tactgaagga 2460  
 agctcagaga agcttgcgca ggtaacgtgt tcccaggctg aggaatgaca gagagatgtt 2520  
 caataccica tgggacagcg tgtcttctc caagactctt gcaagtcata cttaggaatt 2580  
 tctctactt tacactctt gtacaaaaat aaaacaaaac aaaacaaca taacaacaac 2640  
 aacaacaaca ataacaaca caaccatacc agaacaagaa caacggttta catgaacaca 2700  
 gctgtgaag aggcaagaga cagaatgata atccagttag cacagttta ttacgggtg 2760  
 tcagcttgc ttccccgtg ggtcttggg gacagtgtg gtgcgtgtg gtgtgtggg 2820  
 gtgcgtgtg gtatgtgtg gtgtgtact gtltggaaag tacatatgta cacatgtgag 2880  
 gacttgggg cactgaaca gaacgaaca gggcgacccc ttcaaatggc agcatttcca 2940  
 tgaagacaca cttaaaacct acaacttcaa aatgttctg tctatataa aaggaaaaa 3000  
 aataaatata aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3029

17

18

(210) 2

(211) 797

(212) PRT

(213) mouse

(400) 2

Met Ala Trp Asp Met Cys Ser Gln Asp Ser Val Trp Ser Asp Ile Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Ala Ala Leu Val Gly Glu Asp Gln Pro Leu Cys Pro Asp Leu Pro  
 20 25 30  
 Glu Leu Asp Leu Ser Glu Leu Asp Val Asn Asp Leu Asp Thr Asp Ser  
 35 40 45  
 Phe Leu Gly Gly Leu Lys Trp Cys Ser Asp Gln Ser Glu Ile Ile Ser  
 50 55 60  
 Asn Gln Tyr Asn Asn Glu Pro Ala Asn Ile Phe Glu Lys Ile Asp Glu  
 65 70 75 80  
 Glu Asn Glu Ala Asn Leu Leu Ala Val Leu Thr Glu Thr Leu Asp Ser  
 85 90 95  
 Leu Pro Val Asp Glu Asp Gly Leu Pro Ser Phe Asp Ala Leu Thr Asp  
 100 105 110  
 Gly Ala Val Thr Thr Asp Asn Glu Ala Ser Pro Ser Ser Met Pro Asp  
 115 120 125  
 Gly Thr Pro Pro Pro Gln Glu Ala Glu Glu Pro Ser Leu Leu Lys Lys  
 130 135 140  
 Leu Leu Leu Ala Pro Ala Asn Thr Gln Leu Ser Tyr Asn Glu Cys Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Leu Ser Thr Gln Asn His Ala Ala Asn His Thr His Arg Ile Arg  
 165 170 175  
 Thr Asn Pro Ala Ile Val Lys Thr Glu Asn Ser Trp Ser Asn Lys Ala  
 180 185 190  
 Lys Ser Ile Cys Gln Gln Gln Lys Pro Gln Arg Arg Pro Cys Ser Glu  
 195 200 205  
 Leu Leu Lys Tyr Leu Thr Thr Asn Asp Asp Pro Pro His Thr Lys Pro  
 210 215 220  
 Thr Glu Asn Arg Asn Ser Ser Arg Asp Lys Cys Ala Ser Lys Lys Lys  
 225 230 235 240  
 Ser His Thr Gln Pro Gln Ser Gln His Ala Gln Ala Lys Pro Thr Thr  
 245 250 255  
 Leu Ser Leu Pro Leu Thr Pro Glu Ser Pro Asn Asp Pro Lys Gly Ser  
 260 265 270  
 Pro Phe Glu Asn Lys Thr Ile Glu Arg Thr Leu Ser Val Glu Leu Ser  
 275 280 285  
 Gly Thr Ala Gly Leu Thr Pro Pro Thr Thr Pro Pro His Lys Ala Asn  
 290 295 300  
 Gln Asp Asn Pro Phe Lys Ala Ser Pro Lys Leu Lys Pro Ser Cys Lys  
 305 310 315 320  
 Thr Val Val Pro Pro Pro Thr Lys Arg Ala Arg Tyr Ser Glu Cys Ser  
 325 330 335  
 Gly Thr Gln Gly Ser His Ser Thr Lys Lys Gly Pro Glu Gln Ser Glu  
 340 345 350

19

20

Leu Tyr Ala Gln Leu Ser Lys Ser Ser Gly Leu Ser Arg Gly His Glu  
 355 360 365  
 Glu Arg Lys Thr Lys Arg Pro Ser Leu Arg Leu Phe Gly Asp His Asp  
 370 375 380  
 Tyr Cys Gln Ser Leu Asn Ser Lys Thr Asp Ile Leu Ile Asn Ile Ser  
 385 390 395 400

Gln Glu Leu Gln Asp Ser Arg Gln Leu Asp Phe Lys Asp Ala Ser Cys  
 405 410 415  
 Asp Trp Gln Gly His Ile Cys Ser Ser Thr Asp Ser Gly Gln Cys Tyr  
 420 425 430  
 Leu Arg Glu Thr Leu Glu Ala Ser Lys Gln Val Ser Pro Cys Ser Thr  
 435 440 445  
 Arg Lys Gln Leu Gln Asp Gln Glu Ile Arg Ala Glu Leu Asn Lys His  
 450 455 460  
 Phe Gly His Pro Cys Gln Ala Val Phe Asp Asp Lys Ser Asp Lys Thr  
 465 470 475 480  
 Ser Glu Leu Arg Asp Gly Asp Phe Ser Asn Glu Gln Phe Ser Lys Leu  
 485 490 495  
 Pro Val Phe Ile Asn Ser Gly Leu Ala Met Asp Gly Leu Phe Asp Asp  
 500 505 510  
 Ser Glu Asp Glu Ser Asp Lys Leu Ser Tyr Pro Trp Asp Gly Thr Gln  
 515 520 525  
 Pro Tyr Ser Leu Phe Asp Val Ser Pro Ser Cys Ser Ser Phe Asn Ser  
 530 535 540  
 Pro Cys Arg Asp Ser Val Ser Pro Pro Lys Ser Leu Phe Ser Gln Arg  
 545 550 555 560

Pro Gln Arg Met Arg Ser Arg Ser Arg Ser Phe Ser Arg His Arg Ser  
 565 570 575  
 Cys Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Pro Gly Ser  
 580 585 590  
 Arg Ser Ser Ser Arg Ser Cys Tyr Tyr Tyr Glu Ser Ser His Tyr Arg  
 595 600 605  
 His Arg Thr His Arg Asn Ser Pro Leu Tyr Val Arg Ser Arg Ser Arg  
 610 615 620  
 Ser Pro Tyr Ser Arg Arg Pro Arg Tyr Asp Ser Tyr Glu Ala Tyr Glu  
 625 630 635 640  
 His Glu Arg Leu Lys Arg Asp Glu Tyr Arg Lys Glu His Glu Lys Arg  
 645 650 655  
 Glu Ser Glu Arg Ala Lys Gln Arg Glu Arg Gln Lys Gln Lys Ala Ile  
 660 665 670  
 Glu Glu Arg Arg Val Ile Tyr Val Gly Lys Ile Arg Pro Asp Thr Thr  
 675 680 685  
 Arg Thr Glu Leu Arg Asp Arg Phe Glu Val Phe Gly Glu Ile Glu Glu  
 690 695 700  
 Cys Thr Val Asn Leu Arg Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Gly Phe Ile Thr  
 705 710 715 720  
 Tyr Arg Tyr Thr Cys Asp Ala Phe Ala Ala Leu Glu Asn Gly Tyr Thr

21

22

725                      730                      735  
 Leu Arg Arg Ser Asn Glu Thr Asp Phe Glu Leu Tyr Phe Cys Gly Arg  
                     740                      745                      750  
 Lys Gln Phe Phe Lys Ser Asn Tyr Ala Asp Leu Asp Thr Asn Ser Asp  
                     755                      760                      765  
 Asp Phe Asp Pro Ala Ser Thr Lys Ser Lys Tyr Asp Ser Leu Asp Phe  
                     770                      775                      780  
 Asp Ser Leu Leu Lys Glu Ala Gln Arg Ser Leu Arg Arg  
 785                      790                      795

【 0 0 4 5 】

10

(210) 3  
 (211) 24  
 (212) DNA  
 (213) Artificial Sequence  
 (400) 3

acgccctcict gccctccaag ccag

24

【 0 0 4 6 】

(210) 4  
 (211) 24  
 (212) DNA  
 (213) Artificial Sequence  
 (400) 4

tcagtatcic ticcctccaag ttgc

24

【 0 0 4 7 】

(210) 5  
 (211) 20  
 (212) DNA  
 (213) Artificial Sequence  
 (400) 5

gggctgggtgg tggtcggaga

20

【 0 0 4 8 】

(210) 6  
 (211) 20  
 (212) DNA  
 (213) Artificial Sequence  
 (400) 6

tcagcatgga gaggtcaga

20

【 0 0 4 9 】

(210) 7  
 (211) 20  
 (212) DNA  
 (213) Artificial Sequence  
 (400) 7

gagggactat ggatgcctac

20

【 0 0 5 0 】

(210) 8  
 (211) 20  
 (212) DNA  
 (213) Artificial Sequence  
 (400) 8

	23		24
	itgccttgtt caaacggag		20
[0051]			
	<210> 9		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<400> 9		
	tcgtcccgta gacaaaatgg		20
[0052]			
	<210> 10		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<400> 10		
	tcttactcct tggaggccat		20
[0053]			
	<210> 11		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<223> Description of Artificial Sequence: primer sequence for PPARGamma		
	<400> 11		
	atgggtgaaa ctctgggaga		20
[0054]			
	<210> 12		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<223> Description of Artificial Sequence: primer sequence for PPARGamma		
	<400> 12		
	ctaatacaag tccttgtaga		20
[0055]			
	<210> 13		
	<211> 35		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<223> Description of Artificial Sequence: primer sequence for PPARGamma		
	<400> 13		
	tcgagaggga ggaggacaaa ggtcacgttc gggag		35
[0056]			
	<210> 14		
	<211> 37		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<223> Description of Artificial Sequence: primer sequence for PPARGamma		
	<400> 14		
	tcgacccccg aacgtgacct ttgtcctggt cccctgt		37

【図面の簡単な説明】

エクシオンに用いた 5 kb 構築物の地図。導入遺伝子は

【図 1】 図 1 A : トランスジェニックマイクロインジ 50 CAG プロモーターの支配下であり、ラビット  $\beta$ -グロ

ビンイントロン及びそのポリアデニル化部位を含む。サザンブロットに用いたプローブ (PGC-1遺伝子用のプローブ1) 及びノーザンブロットに用いたプローブ

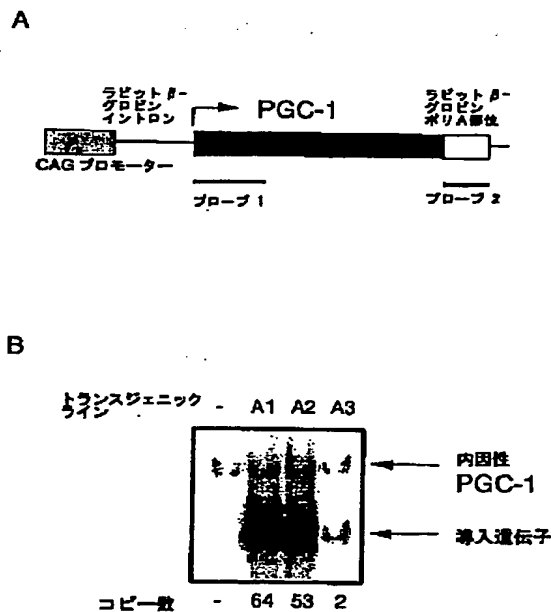
(PGC-1 mRNA用のプローブ1及び導入遺伝子に特異的なプローブ2) を導入遺伝子の地図上に示した。図1B: PGC-1トランスジェニックマウスのキャラクタリゼーション。3つのトランスジェニックF1マウス、A1、A2、及びA3を尾のサザンブロット分析により同定した。各ラインのコピー数はサザンブロットからのデンストメトリスキャンニングにより評価して、A1: 64、A2: 53、及びA3: 2であった。

【図2】 マウスにおけるPGC-1導入遺伝子及び変化したレベルのUCPのの発現を示す。PGC-1トランスジェニックマウス (ラインA) 及びリッターメイト対照マウス由来の組織におけるPGC-1 (A)、UCP-1 (B、C)、UCP-3 (D)、及びUCP-2 (E) mRNAの発現のノーザンブロット分析。褐色脂肪組織 (BAT)、心臓、腎臓、肝臓及び骨格筋由来のRNAを分析した。各レーンには20  $\mu$ gの全RNAを含む。GAPDHのmRNAを対照 (F) として調べた。

【図3】 A: リッターメイト対照マウス及びPGC-1トランスジェニックマウスのBAT重量の比較を示す。縦軸はBAT重量の平均値 $\pm$ 標準誤差 (マウス群あたりn=6、 $p<0.05$ ) である。

B、C: リッターメイト対照マウス及びPGC-1ト

【図1】



ンスジェニックマウスのBATの形態の比較。BATを12週齢のPGC-1トランスジェニックマウス及びリッターメイト対照マウスから除去し、Bは、組織をバラホルムアルデヒドで固定し、ヘマトキシリン及びエオシン (H&E) により染色したものである。CはBに示したのと同じマウス由来のセクションのUCP-1の免疫組織化学である。倍率400x。

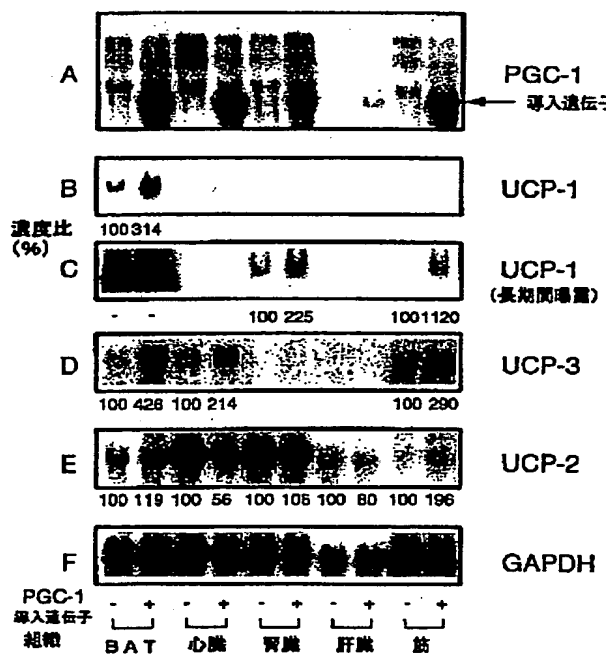
D、E: BATの脂肪滴の直径 (D) 及び数 (E) の比較を示す。脂肪滴の直径を測定し、Bに示したセクションからの10個の細胞当たりの数を数えた。縦軸は平均値 $\pm$ 標準誤差 (脂肪滴直径についてn=20、 $p<0.001$ 、脂肪滴数についてn=6、 $p<0.05$ ) である。

【図4】 雌のPGC-1トランスジェニックマウスの表現型を示す。A: 24週齢で測定した場合、PGC-1トランスジェニックマウスはリッターメイト対照マウスより有意に軽かった。縦軸は体重の平均値 $\pm$ 標準誤差 (マウス群あたりn=6、 $p<0.05$ ) である。

B、C: 静止 (B) 及び全 (C) エネルギー消費量は12週齢においてリッターメイト対照よりPGC-1トランスジェニックマウスにおいて有意に大きかった。縦軸はエネルギー消費量の平均値 $\pm$ 標準誤差 (マウス群あたりn=6、 $p<0.05$ ) である。

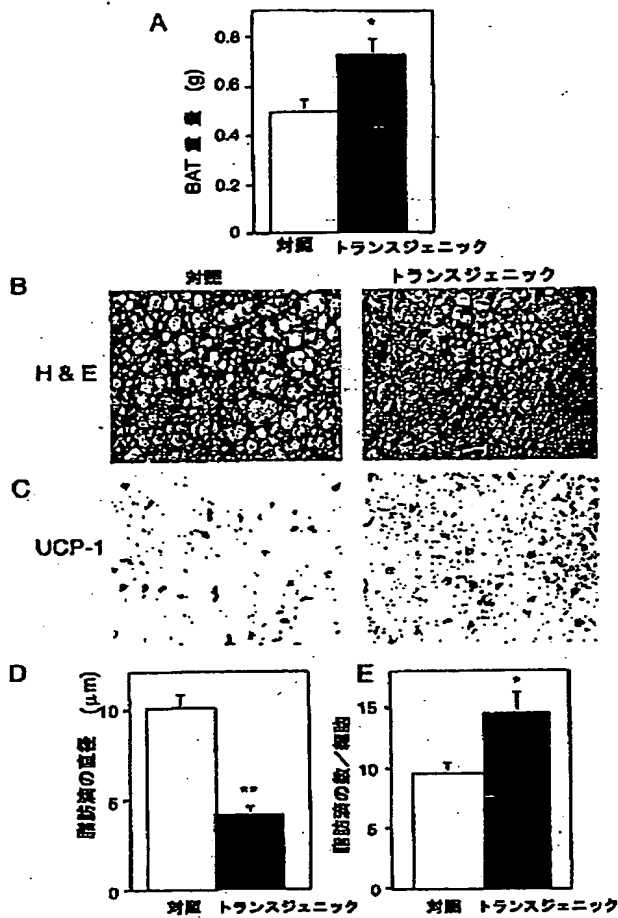
【図5】 PGC-1によるPPAR $\gamma$ の転写調節活性を示す。

【図2】

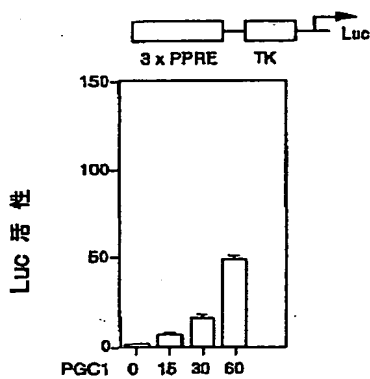




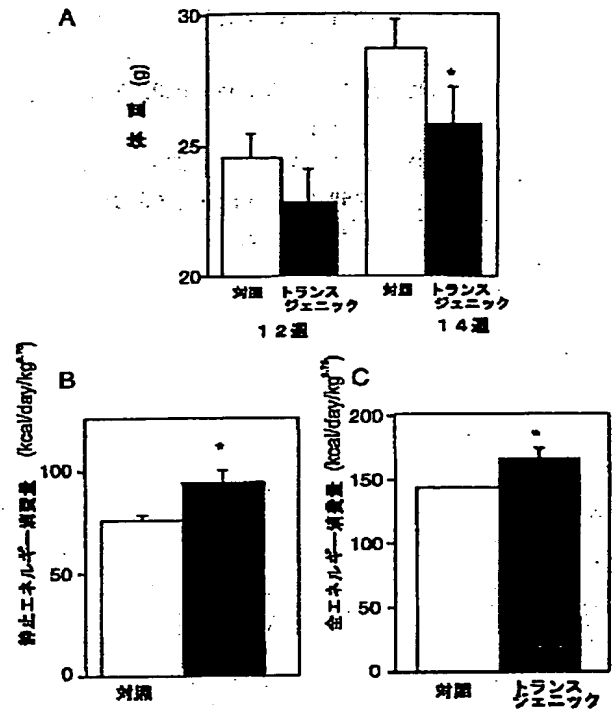
【図3】



【図5】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>

33/50

// C12Q 1/66

識別記号

F I

C12Q 1/66

C12R 1:91

テマコード (参考)

(C12Q 1/02  
C12R 1:91 )

C12N 15/00

ZNA A

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 DA13 DA36 FB02  
FB12 GC15  
4B024 AA11 BA63 BA80 DA02 EA04  
GA11 HA01  
4B063 QA01 QA18 QQ20 QR02 QR59  
QR69 QR77 QR80 QS03 QS24  
QS28 QS36 QX02

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**